

(19)



Eur päisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 148 463**  
**A2**

(12)

# **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 84115628.8

(51) Int. Cl.: G 01 N 21/47, G 01 N 33/53

(22) Anmeldetag: 17.12.84

(30) Priorität: 27.12.83 DE 3347162

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE Aktiengesellschaft,**  
Postfach 1140, D-3550 Marburg 1 (DE)(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung: 17.07.85  
Patentblatt 85/29(72) Erfinder: Metzmann, Erwin, Dr., Höhenweg 44,  
D-3550 Marburg 1 (DE)(84) Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU  
NL SE(74) Vertreter: Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr. et al,  
**HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale Patentabteilung**  
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt/Main 80 (DE)

(54) **Photometrisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung bei Reaktionen, die unter Bildung oder Verbrauch von Streuzentren verlaufen.**

(57) Es wird ein Verfahren zur photometrischen Bestimmung der Konzentration eines Reaktanden einer Reaktion beschrieben, die unter Bildung oder Verbrauch von Streuzentren im Sinne eines Übergangs von der Rayleigh- zur Mie-Streuung verläuft, bei welchem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) und die Zeit vom Reaktionsbeginn bis zum Auftreten der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $t_{\max}$ ) bestimmt werden.

Zur eindeutigen Bestimmung der Konzentration wird der funktionelle Zusammenhang zwischen Konzentration,  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  mit einem Standardpräparat empirisch ermittelt,  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  an der Probe gemessen und mittels der am Standardpräparat ermittelten Beziehung zwischen der Konzentration des Reaktanden und  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  die Konzentration des Reaktanden bestimmt.

EP 0 148 463 A2

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

83/B 023

Dr. Ha/gä

Photometrisches Verfahren zur Konzentrationsbestimmung  
bei Reaktionen, die unter Bildung oder Verbrauch von  
Streuzentren verlaufen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der  
Konzentration eines Partners einer Reaktion mittels  
einer Lichtstreuungsmessung.

- 5 Das Phänomen der Lichtstreuung an Teilchen, die sich in  
einem homogenen Medium befinden, wird sowohl über die  
Messung der Streulichtintensität (Nephelometrie) als  
auch über die Messung des Intensitätsverlustes des durch  
das Medium tretenden Lichtstrahls (Turbidimetrie) zur  
10 Konzentrationsbestimmung genutzt.

- Viele chemische Reaktionen führen in mehreren Schritten  
zu Molekülaggregaten oder Makromolekülen, die sich in  
ihrem Streulichtverhalten sehr stark von den Ausgangs-  
15 stoffen unterscheiden und deren Konzentration über diese  
Eigenschaft bestimmt werden kann.

- Zum Beispiel treten bei Überschreitung des Löslichkeits-  
produktes sehr viele Ionen zu Kristallen zusammen, die  
20 zunächst als Trübung erscheinen und schließlich so groß  
werden, daß sie aus der flüssigen Phase sedimentieren.

- Ein anderes Beispiel ist die immunchemische Reaktion  
zwischen einem löslichen Antigen und einem bivalenten  
25 Antikörper, die zu großen und stark lichtstreuenden Mo-  
lekülaggregaten führen kann.

Der zeitliche Verlauf solcher Reaktionen entspricht sehr

häufig dem allgemeinen kinetischen Verlauf aufeinanderfolgender Reaktionen 1. Ordnung, das heißt die Konzentrationskurve für die Bildung des Endproduktes zeigt einen Wendepunkt und somit tritt die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erst im Laufe der Reaktion auf.

Am Beispiel einer immunchemischen Reaktion ist dieser Verlauf für zwei Antigenkonzentrationen in Fig. 1 dargestellt.

- 10 Aus den Signal-Zeit-Kurven in Fig. 1 kann auf verschiedene Weise ein konzentrationsabhängiges Meßsignal gewonnen werden (Tab. 1).

15 Tab. 1: Zeitliche Randbedingungen bei der Gewinnung von konzentrationsabhängigen Meßsignalen (S=Signal, t=Zeit)

Name	Prinzip
20 1) Endpunktverfahren	Das Meßsignal wird zu einem so späten Zeitpunkt ermittelt, bei dem es sich erfahrungsgemäß nicht mehr verändert, aber noch keine Präzipitation stattfindet.
25 2) Kinetisches Verfahren "fixed-time Kinetik"	Das eigentliche Meßsignal ist die Differenz zweier Signale, die zu verschiedenen, aber fest vorgegebenen Zeitpunkten ermittelt werden.
30 3) Kinetisches Verfahren "rate determination"	Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, d.h. die maximale Änderung des Signals pro Zeiteinheit, wird ermittelt:
35 "peak rate method"	a) durch Messung von $\Delta S$ in hinreichend kurzen Intervallen von $\Delta t$ und Bestimmung des größ-

- ten Quotienten  $\Delta S / \Delta t$ .
- b) elektronische Differenzierung  $dS/dt$  und Bestimmung des Maximums
  - c) Konstruktion der Tangente an die Signal/Zeit-Kurve und Bestimmung der maximalen Steigung.

5

10 Eine große Zahl von Analyten kann heute nach den in Tab. 1 aufgeführten Verfahren mit direkter oder indirekter Streulichtmessung quantifiziert werden.

15 Betrachtet man die Abhängigkeit eines geeigneten Meßsignals (Tab. 1) von der Konzentration eines Reaktionspartners, z. B. des Antigens, während der andere Reaktionspartner mit konstanter Konzentration eingesetzt wird, so kann man zum Beispiel bei immunchemischen Reaktionen, den in Abb. 2 dargestellten Zusammenhang beobachten. Die überraschende Tatsache, daß das gleiche

20 Meßsignal sowohl auf eine niedrige als auch auf eine hohe Konzentration des Analyten zurückgeführt werden kann, führt zu einer Zweideutigkeit der Signal-Konzentration-Beziehung, die dem Fachmann als Antigenüberschuß-Phänomen oder Heidelbergerkurve bekannt ist.

25

Diese Zweideutigkeit ist prinzipiell überall dort beobachtbar, wo Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrie möglich sind, je nach Überschuß des einen oder anderen Reaktionspartners, und sich diese Komplexe in ihrer Signaleigenschaft, zum Beispiel Streulicht, nicht unterscheiden.

30

zum Beispiel:

- $\text{Mon}_x\text{CoMon}_{x+m}$  und  $\text{Mon}_{x+m}\text{CoMon}_x$  wobei Mon = Monomer  
 CoMon = Co-Monomer  
 5  $\text{Ag}_2 \text{ Ak}$  und  $\text{AgAk}_2$  wobei Ag = Antigen  
 Ak = homologer  
 Antikörper  
 $\text{Lec}_2 \text{ GP}$  und  $\text{Lec GP}_2$  wobei Lec = Lectin  
 GP = Glykoprotein  
 10  $(\text{Ag}_x\text{Cl}_{x+1})^-$  und  $(\text{Ag}_{x+1}\text{Cl}_x)^+$  wobei Ag = Silberion  
 Cl = Chloridion

Führt man solche Reaktionen zum Zwecke der Konzentra-  
 tionsbestimmung durch, so definiert und optimiert man  
 15 das Verfahren für eine bestimmte Überschuß-Situation. In  
 der Praxis führt dies dort zu Schwierigkeiten, wo der  
 Analyt in einem sehr großen Konzentrationsbereich vor-  
 liegen kann und der Konzentrationsüberschuß eines Reak-  
 tionsteilnehmers nicht sichergestellt werden kann.

20

Diese Situation spielt besonders eine Rolle bei der  
 immunchemischen Bestimmung der Immunglobuline, deren  
 Konzentration um den Faktor 1000 schwanken kann. Die  
 Testbedingungen und die ökonomisch optimale Antikörper-  
 25 konzentration zur Bestimmung der normalen und subnorma-  
 len Konzentration erlauben nicht die Erfassung einer um  
 den Faktor 1000 erhöhten Konzentration.

Das folgende bezieht sich deshalb nur auf immunchemische  
 Reaktionen, obwohl das Verfahren prinzipiell auf alle  
 30 Reaktionen anwendbar ist, welche die oben erörterten  
 Eigenschaften aufweisen und ein analoges kinetisches  
 Verhalten zeigen.

In Bezug auf immunchemische Reaktionen sind eine Fülle  
 35 von Verfahren und Ausführungsformen bisher vorgeschlagen  
 worden, um zu erkennen, auf welchem Teil der Heidel-

bergerkurve man sich mit einem gegebenen Analysenansatz befindet.

Im folgenden seien einige Beispiele genannt:

5

1. Das älteste und sicherste Verfahren zur Erkennung eines Antigenüberschusses ist die Durchführung einer Doppelbestimmung mit zwei verschiedenen Probenverdünnungen. Beim Vorliegen eines Antigenüberschusses erhält man bei der größeren Verdünnung ein höheres Signal und findet scheinbar einen höheren Proteingehalt als bei der konzentrierteren Probe. (H. E. Schultze u. G. Schwick; Prot. Biol. Fluids 5, 15-25 (1958)).

10

Verbesserte Ausführungsformen dieses Verfahrens sehen den weiteren Zusatz von Antikörpern in den Testansatz vor, nachdem die Reaktion ein gewisses Gleichgewicht erreicht hat. Beim Vorliegen eines Antigenüberschusses tritt dann eine Signalerhöhung ein (T. O. Tiffany et al., Clin. Chem. 20, 1055 - 1061 (1974)). Ebenso läßt sich ein Antigenüberschuß durch Nachdosieren mit Antigenmaterial bekannter Konzentration erkennen (J. C. Sternberg; Clin. Chem. 23, 1456 - 1464 (1977)).

15

20

2. Im speziellen Fall der continuous-flow-Technik wird das Vorliegen eines Antigenüberschusses durch Auftreten eines Doppelpeaks bemerkt (R. F. Ritchie; Protides Biol. Fluids 21, 569 (1974)).

25

3. Durch Betrachtung der Reaktionskinetik nach graphischer Aufzeichnung des Reaktionsverlaufes kann man bei turbidimetrischer Messung zwischen Antikörperüberschuß und "mildem" Antigenüberschuß unterscheiden (I. Deverill; Protides Biol. Fluids 26, 697 (1979)) (P. J. J. Van Munster et al., Clin. Chim.

30

35

Acta 76, 377 - 388 (1077)).

4. Durch Bestimmung der Reaktionsdauer bis zum Auftreten der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei nephelometrischer Messung kann eine Größe berechnet werden, die eine Diskriminierung zwischen Antigen- und Antikörperüberschuß erlaubt (DE-A-27 24 722 C2).

Die unter den Punkten 2 und 4 genannten Verfahren unterscheiden sich vorteilhaft von den anderen Techniken dadurch, daß nicht alle Proben auf das Vorliegen eines Antigenüberschusses überprüft werden müssen, sondern daß während des Meßvorganges eine Information darüber erhalten wird, ob eine Prüfung auf Antigenüberschuß durchgeführt werden muß.

Verfahren 2 ist an eine bestimmte Technik gebunden und nicht allgemein für nephelometrische oder turbidimetrische Proteinbestimmungen anwendbar.

- DE-A-27 24 722 C2 als Stand der Technik geht davon aus, daß eine Funktion der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit existiert, die es erlaubt, mit Hilfe eines Schwellenwertes dieser Funktion zwischen Antigenüberschuß und Antikörperüberschuß zu diskriminieren (Anspruch 1). In Spalte 12, Zeile 8 - 21 dieser Patentschrift wird ausgeführt, daß als Diskriminatorfunktion die Zeit (T) dienen kann, die von der Reaktionsauslösung bis zum Auftreten des Maximalwertes (H) der Reaktionsgeschwindigkeit verstreicht. Diese Ausführungen werden jedoch in Spalte 21, Zeilen 55 - 68, stark eingeschränkt, dort heißt es, daß kein einzelner Zeitwert existiert, bei dem der Antikörperüberschuß-Kurventeil auf der einen Seite

dieses Wertes und der Antigenüberschuß-Kurventeil auf der anderen Seite läge. Die Erfindung löst das Problem durch Koordinatentransformation und die Einführung neuer Variablen.

- 5 Das Verfahren ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß bei Feststellung eines Antigenüberschuß-Zustandes die Messung nach entsprechender Verdünnung der Probe zur Erzielung eines Antikörperüberschuß-Zustandes wiederholt
- 10 wird. Diese zusätzliche Messung einer Probe, die im Antigenüberschuß-Zustand gefunden wird, ist material- und zeitaufwendig.

- 15 Der Erfindung liegt deshalb als Aufgabe die Schaffung eines Verfahrens zugrunde, welches es erlaubt, ohne zusätzliche Messung den Gehalt einer Probe an einem Antigen oder Antikörper zu bestimmen, auch wenn sich diese im Antigenüberschuß-Zustand des jeweiligen Testansatzes befindet.

- 20 Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß durch Messung der Zeit, die von der Reaktionsauslösung bis zum Auftreten des Maximalwertes der Reaktionsgeschwindigkeit verstreicht, bei einem kinetischen Verfahren, d.h. bei
- 25 Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Konzentration, auf beiden Seiten der Heidelbergerkurve quantitativ gemessen werden kann. Eine Unterscheidung zwischen Antikörperüberschuß und Antigenüberschuß ist nicht mehr notwendig.

- 30 Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Verfahren zur photometrischen Bestimmung der Konzentration eines Reaktanden einer Reaktion, die unter Bildung oder Verbrauch von Streuzentren im Sinne eines Übergangs von der
- 35 Rayleigh- zur Mie-Streuung verläuft, bei welchem die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) und die



Zeit vom Reaktionsbeginn bis zum Auftreten der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $t_{\max}$ ) bestimmt werden, dadurch gekennzeichnet, daß zur eindeutigen Bestimmung der Konzentration der funktionelle Zusammenhang zwischen Konzentration,  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  mit einem Standardpräparat empirisch ermittelt,  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  an der Probe gemessen und mittels der am Standardpräparat ermittelten Beziehung zwischen der Konzentration der Reaktanden und  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  die Konzentration des Reaktanden bestimmt wird.

Die Beziehung zwischen Konzentration und  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  kann beispielsweise in einer Tabelle, einer Matrix oder einer oder mehreren mathematischen Funktionen wiedergegeben sein.

Es ist bekannt, daß Reaktionsgeschwindigkeit und Signalintensität von Antigen-Antikörper-Reaktionen nach Ionenstärke, Ionenart und Polymerzusatz des Reaktionsmediums in einem weiten Bereich beeinflußt werden können. Die folgenden Ausführungen beschränken sich deshalb nicht auf die in den Beispielen aufgeführten Bedingungen sondern gelten für Präzipitatsreaktionen, die sich im oben genannten Sinne beeinflussen lassen.

Bestimmt man die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) in Abhängigkeit von der Konzentration, so erhält man den in Fig. 2 dargestellten Zusammenhang. Bestimmt man gleichzeitig mit  $V_{\max}$  die Zeit, die von Beginn der Reaktion bis zum Erreichen von  $V_{\max}$  verstreicht ( $t_{\max}$ ), so ergibt sich der in Fig. 3 dargestellte Zusammenhang. Jede der beiden Signal-Konzentrationskurven zeigt das Antigenüberschuß-Phänomen; bestimmten Signalen können zwei Konzentrationen zugeordnet werden.

Projiziert man die beiden Funktionen in eine Abbildung

(Fig. 4), so erkennt man, daß kein Wertepaar ( $V_{\max}$ ,  $t_{\max}$ ) existiert, das zwei verschiedenen Konzentrationen zugeordnet werden kann.

- 5 Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) und die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $t_{\max}$ ) sind offensichtlich voneinander unabhängige Variable der Konzentration, und die Heidelbergerkurve ist eine dreidimensionale Kurve (Fig. 5), die bei  
10 geeigneter Reaktionsführung keine Doppeldeutigkeit im Hinblick auf die Konzentration zeigt.

Meßverfahren, bei denen nur mit einer zweidimensionalen Projektion dieser Kurve gearbeitet wird, z. B. Messung  
15 von  $V_{\max}$  als Funktion der Konzentration (Fig. 6), zeigen immer eine Doppeldeutigkeit im Hinblick auf die Konzentration.

- Bei der praktischen Auswertung der gefundenen Zusammenhänge ist zu beachten, daß in der Nähe des Minimums oder  
20 des Maximums einer Signal-Konzentrations-Kurve die Konzentration nur mit einer verminderten Präzision bestimmt werden kann, da relativ geringe Signaldifferenzen einer großen Konzentrationsdifferenz entsprechen. Bei dem  
25 neuen Verfahren der Bestimmung zweier unabhängiger Meßsignale wird die Präzision besonders dann verbessert, wenn das Minimum der Funktion  $\text{Konz.} = f(t_{\max})$  möglichst weit von dem Maximum der Funktion  $\text{Konz.} = f(V_{\max})$  entfernt ist.

30

Arbeitsweise und Reaktionsbedingungen des neuen Verfahrens sollen in den folgenden Beispielen gezeigt werden.

**Beispiel 1: Bestimmung des Maximum-Bereiches einer Kalibrationskurve für IgG**

5      Photometer: DU-8 mit Zusatzteil für nephelometrische  
Messungen (Beckman Instruments)

10      Reaktionsmedium: 0.02 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7.3  
mit 40 g/l Polyäthylenglycol 6000  
(Serva), Heidelberg, Bundesrepublik  
Deutschland und 64 g/l Natriumbromid

Probenverdünnungsmedium: Physiologische NaCl-Lösung

15      Antiserum: LN-Antiserum gegen Human IgG/kappa-Kette (vom  
Kaninchen) (Behringwerke AG, OSAS 14), 1:31  
mit Reaktionsmedium verdünnt

20      Standard: T-Protein-Standard-Serum (human), (Behring-  
werke AG, OSKT 06)

25      Testansatz: 20 µl Proben-/Standardverdünnung werden mit  
500 µl Antiserumverdünnung versetzt und so-  
fort im Photometer unter Verwendung des Ki-  
netik II-Programmes maximal 3 min. bei einer  
Wellenlänge von 334 nm gemessen

## a) Turbidimetrische Messung

	Konzentration der Standardverdünnung in mg/dl IgG	Maximale Reak- tionsgeschwin- digkeit ( $V_{\max}$ in mE/min)	Zeit von Reak- tionsbeginn bis zum Auftreten des Maximums ( $t_{\max}$ in sec.)
5	110.4	425	38
	92	466	30
	78.9	542	24
	73.6	569	20
	69	583	18
10	64.9	576	16
	61.3	567	16
	55.2	548	14
	22.1	219	20
	11.0	75	30

## b) Nephelometrische Messung

	Konzentration der Standardverdünnung in mg/dl IgG	Maximale Reak- tionsgeschwin- digkeit ( $V_{\max}$ in mE/min)	Zeit vom Reak- tionsbeginn bis zum Auftreten des Maximums ( $t_{\max}$ in sec.)
25	110.4	1410	36
	92	1490	30
	78.9	1710	22
	73.6	1730	22
	69	1780	20
30	64.9	1800	20
	61.3	1810	20
	55.2	1720	18
	22.1	706	24
	11.0	325	42

Beispiel 1 zeigt, daß sowohl bei turbidimetrischer als auch bei nephelometrischer Messung Konzentrationen im und zu beiden Seiten des Maximums der Heidelbergerkurve eindeutig bestimmt werden können. Zur Ermittlung einer  
5 unbekannten Probenkonzentration wird nach Messung von  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  zwischen den tabellierten Werten des Standards interpoliert. Der Meßbereich wird durch geeignete Verdünnung der Proben festgelegt, in Beispiel 1 bei  
10 1:51 Verdünnung der Probe von 560 bis 5600 mg/dl IgG, und kann so gewählt werden, daß der Teilbereich mit der geringeren Präzision nicht in den klinisch relevanten Entscheidungsbereich des entsprechenden Parameters fällt.

15 Beispiel 2: Aufnahme einer Kalibrationskurve für IgM  
(turbidimetrisch)

Photometer: DU-8 (Beckman Instruments)

20 Reaktionsmedium: 0.15 m NaCl-Phosphatpuffer pH 7.2 mit  
39 g/l PEG 6000 (Serva) und 8 g/l NaCl

Probenverdünnungsmedium: Physiologische NaCl-Lösung

25 Antiserum: LN-Antiserum gegen Human IgM/ $\mu$ -Kette (vom Kaninchen) (Behringwerke AG, OSAT 14), 1:11 mit Reaktionsmedium verdünnt

Standard: T-Protein-Standard-Serum (human), (Behring-  
30 werke AG, OSKT 06)

Testansatz: 200  $\mu$ l Proben-/Standardverdünnung werden mit  
500  $\mu$ l Antiserumverdünnung versetzt und so-  
fort im Photometer unter Verwendung des Ki-  
35 netik II-Programmes maximal 3 min. bei einer

## Wellenlänge von 312 nm gemessen

Konz.Stand. verdünnung	Konz.Probe 1:2l-Verdünn. in mg/dl IgM	Max.Reakt. geschwind. (V <sub>max</sub> in mE /min)	Zeit v.Reakt. beginn bis Maximum (t <sub>max</sub> in sec.)
5	110	2310	371
	74	1540	508
10	55	1155	591
	44	924	639
	37	770	639
	31	660	620
	28	578	611
15	24	513	598
	22	462	556
	20	420	508
	18	385	488
	17	355	467
20	16	330	460
	15	308	419
	14	290	405
	13	272	378
	12	257	368
25	11	231	330
	5.5	116	158
	2.8	58	69
	1.4	29	27

Aus Beispiel 2 läßt sich entnehmen, daß bei der gewählten Probenverdünnung eine Konzentration zwischen 30 und 600 mg/dl IgM mit einer besseren Präzision gemessen werden kann als zwischen 600 und 900 mg/dl. Bei einem Normalbereich zwischen 70 und 300 mg/dl IgM im Serum legen  
5 jedoch Werte oberhalb von 600 mg/dl stets den Verdacht auf eine monoklonale Gammopathie nahe und erfordern, unabhängig von der Präzision des Wertes, weitere Untersuchungen.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur photometrischen Bestimmung der Konzen-  
tration eines Reaktanden einer Reaktion, die unter  
Bildung oder Verbrauch von Streuzentren im Sinne  
eines Übergangs von der Rayleigh- zur Mie-Streuung  
5 verläuft, bei welchem die maximale Reaktionsgeschwin-  
digkeit ( $V_{\max}$ ) und die Zeit vom Reaktionsbeginn bis  
zum Auftreten der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  
( $t_{\max}$ ) bestimmt werden, dadurch gekennzeichnet, daß  
zur eindeutigen Bestimmung der Konzentration der  
10 funktionelle Zusammenhang zwischen Konzentration,  
 $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  mit einem Standardpräparat empirisch  
ermittelt,  $V_{\max}$  und  $t_{\max}$  an der Probe gemessen und  
mittels der am Standardpräparat ermittelten Beziehung  
zwischen der Konzentration des Reaktanden und  $V_{\max}$   
15 und  $t_{\max}$  die Konzentration des Reaktanden bestimmt  
wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die Reaktion eine immunchemische Reaktion ist.  
20
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die photometrische Bestimmung mittels einer  
Durchlicht-Messung (turbidimetrisches Verfahren) aus-  
geführt wird.  
25
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
daß die photometrische Bestimmung mit Strahlung einer  
Wellenlänge von 240 bis 700 nm, vorzugsweise jedoch  
von 300 bis 380 nm, ausgeführt wird.  
30



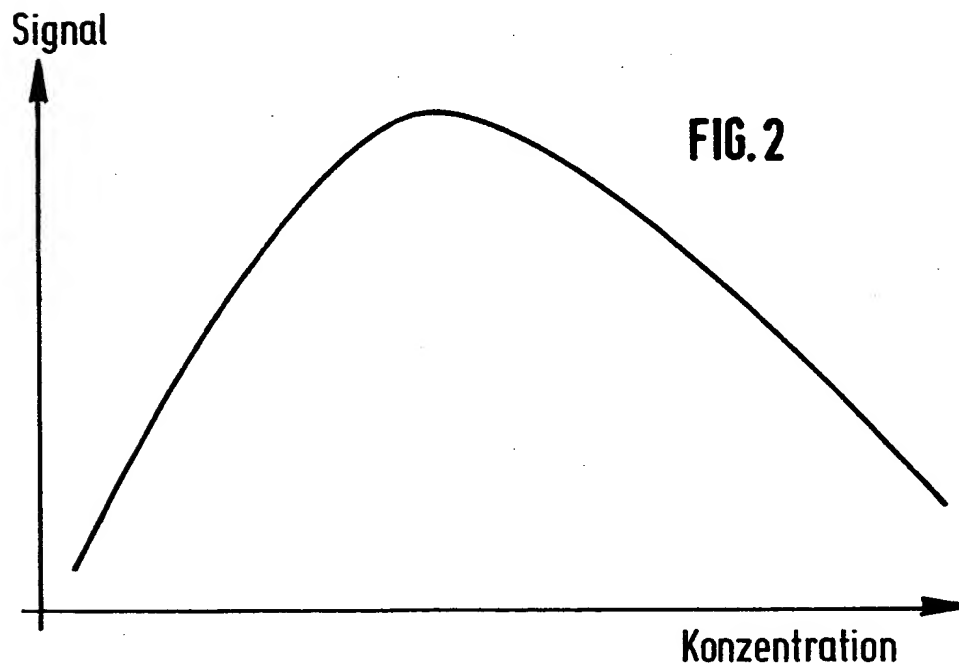
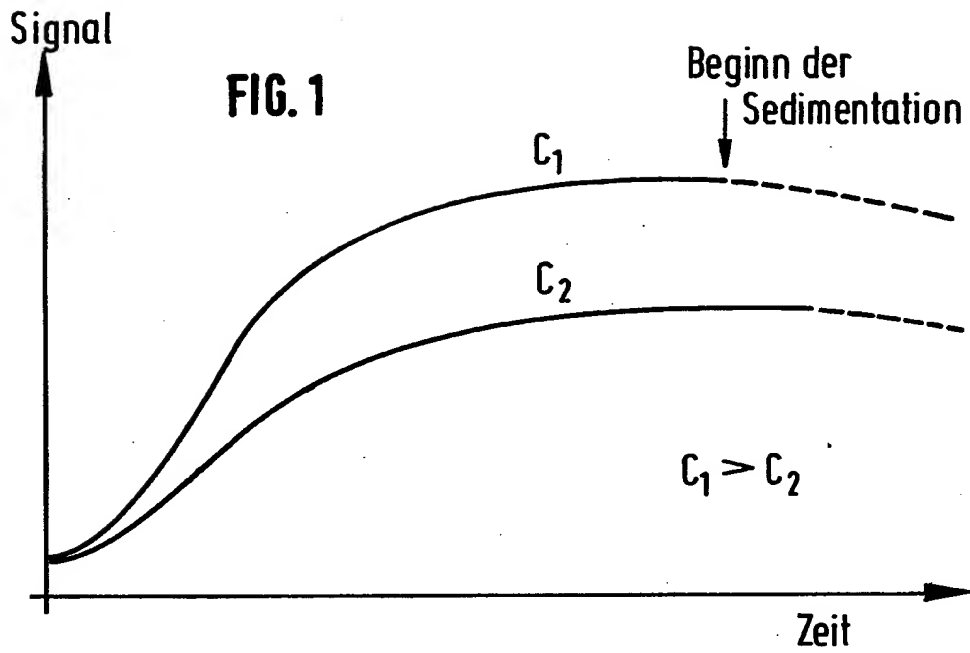
0148463

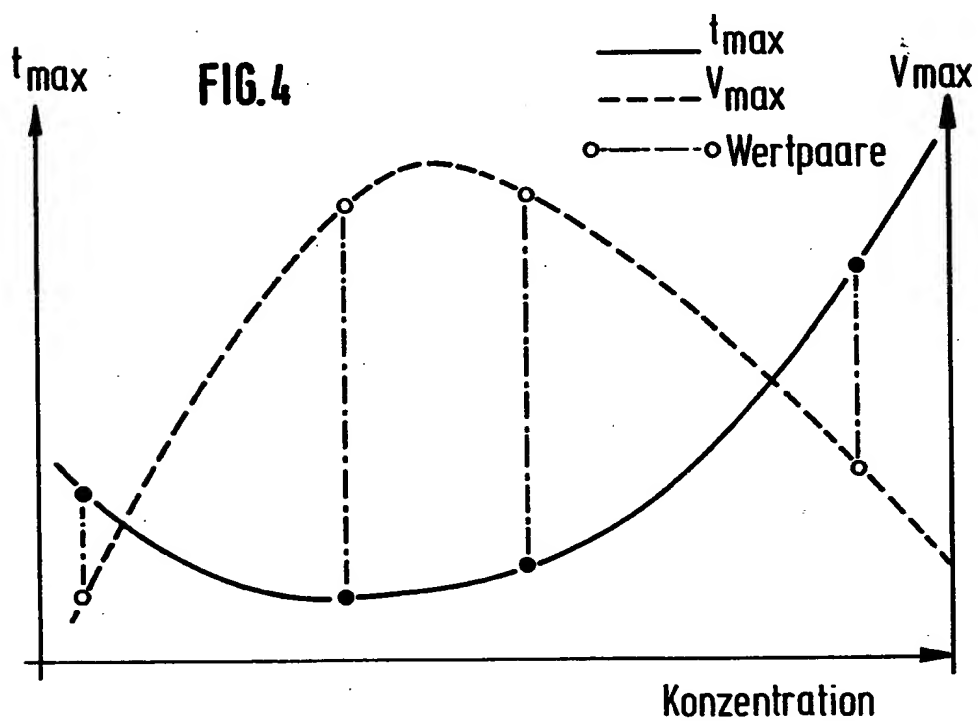
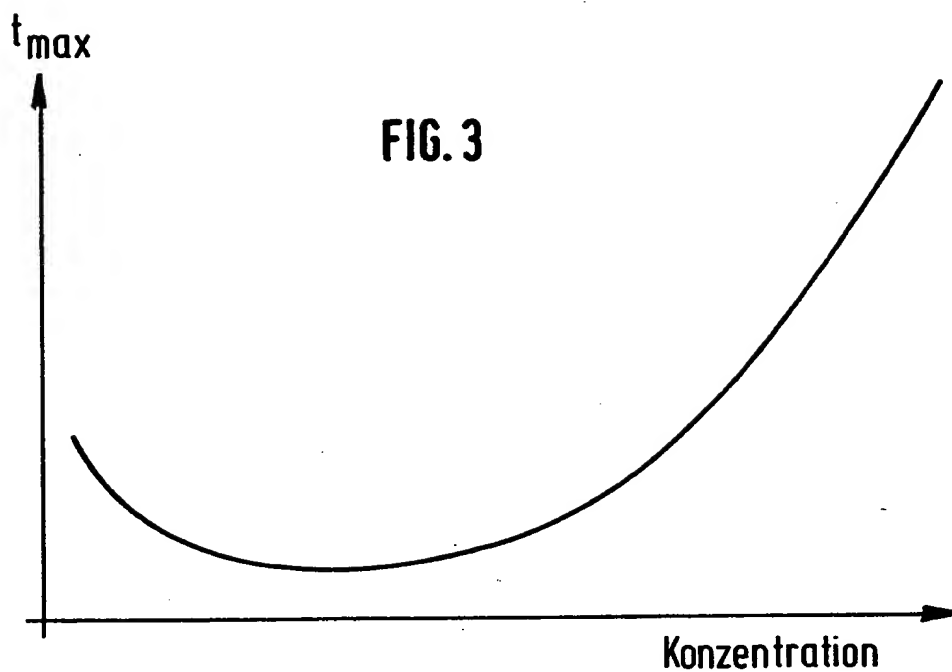
- 16 -

HOE 83/B 023

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die photometrische Bestimmung mittels einer Streulicht-Messung (nephelometrisches Verfahren) ausgeführt wird.

5





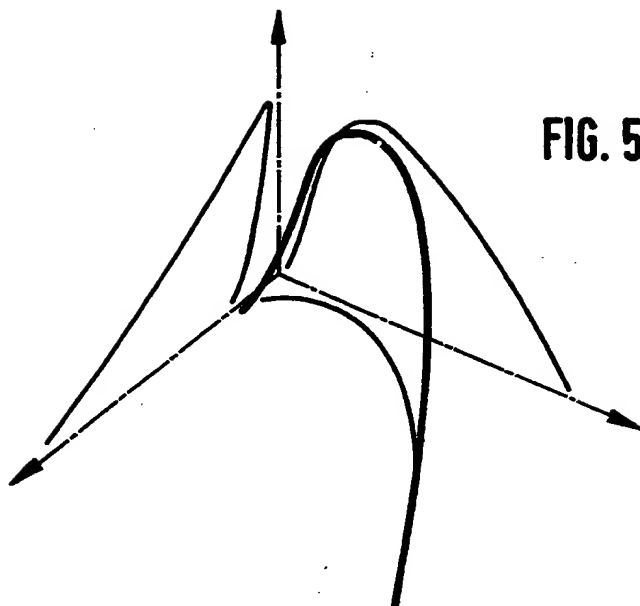


FIG. 5

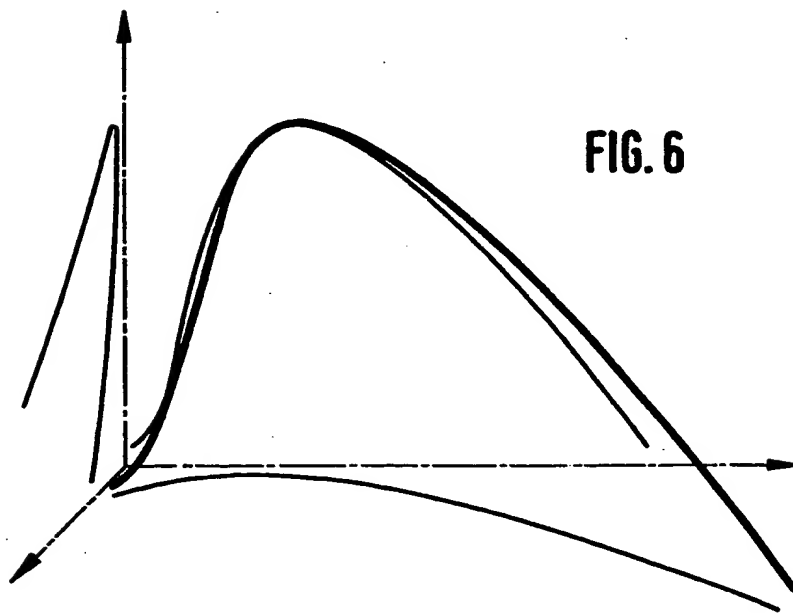


FIG. 6